

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 674 755

(21) N° d'enregistrement national :

91 04194

(51) Int Cl⁵ : A 61 K 37/02, 39/02, 31/355, 31/07, 31/51

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 05.04.91.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 09.10.92 Bulletin 92/41.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : THOREL Jean-Noël — FR et
MOREAU Pierre — FR.

(72) Inventeur(s) : Thorel Jean-Noël, Moreau Pierre et
Jacotot Bernard.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Bruder Michel.

(54) Nouvelles compositions médicamenteuses immunostimulatrices.

(57) Les compositions médicamenteuses immunostimulatrices conformes à l'invention se révèlent donc à propriétés très renforcées par rapport à celles de l'art antérieur, grâce au fait qu'elles contiennent au moins un immunostimulateur associé avec au moins un micronutriment, les immunostimulateurs comprenant des éléments bactériens (tels que des bactéries proprement dites, des fractions de germes, des glycoprotéines ou des ribosomes bactériens et des protéoglycanes membranaires), des polypeptides biologiques et/ou des immunostimulants de synthèse, les micronutriments comprenant, de leur côté, des oligoéléments, des vitamines et/ou des acides aminés essentiels.

FR 2 674 755 - A1



Nouvelles compositions médicamenteuses immunostimulatrices

La présente invention a pour objet de nouvelles compositions médicamenteuses immunostimulatrices.

5 La plupart des médicaments immunostimulateurs actuellement disponibles ne possèdent pas, pour la plupart, une activité importante in vivo, présentent parfois des effets secondaires comme c'est le cas pour la lévamisole ou nombre d'interférons, ou voient leur activité rapidement décroître comme certains
10 facteurs thymiques. On retiendra néanmoins que les principaux immunostimulateurs appartiennent aux classes non limitatives suivantes:

- bactéries et dérivés plus ou moins purifiés, par exemple, fractions de divers germes (Imocur des
15 Laboratoires Fournier), glycoprotéines extraites de klebsiella pneumoniae (Biostim des Laboratoires Cassenne), ou ribosomes bactériens et protéoglycanes membranaires (Ribomunyl des Laboratoires Inava);
- polypeptides biologiques: interférons (IFN),
20 lymphokines, facteurs thymiques, immunoglobulines (Ig),
- immunostimulants synthétiques: Imuthiol (diéthylthiocarbamate de sodium), Inosiplex (ou Isoprinosine des Laboratoires Delalande).

A cette liste non exhaustive de types et selon des études
25 récentes, on peut ajouter des micronutriments qui sont considérés comme présentant des activités immunostimulantes; on peut citer entre autres:

- des éléments traces ou oligoéléments, tels que le zinc, le cuivre, le fer, le manganèse ou le sélénium;

- des vitamines, par exemple E, A, B6, B9 ou omega;
- des acides aminés tels que l'alanine (Ala), la glycine (Gly), la thréonine (Thr) ou l'acide aspartique (Asp).

5 Les divers types d'immunostimulants classiques ne présentent pas d'activité suffisamment efficace et polyvalente, et les micronutriments ne semblent pas apporter de résultats améliorés par rapport à ces derniers.

10 On rappellera néanmoins les propriétés essentielles des principaux composants auxquels la présente invention fait appel.

Il est généralement admis que les micronutriments ci-après mentionnés sont considérés comme immunostimulants bien que l'expérience montre qu'ils se comportent plutôt en
15 immunomodulateurs.

1 Eléments-traces essentiels.

1,1 Zinc

Il joue un rôle important dans le métabolisme cellulaire (division cellulaire, réplication et transcription de l'acide
20 désoxyribonucléique (ADN) en s'intégrant dans les enzymes telles que l'ADN-polymérase; son action immunitaire s'exerce à trois niveaux:

au niveau du tissu lymphoïde: sa carence entraîne l'atrophie réversible du thymus, de la rate et des ganglions
25 lymphatiques; son administration stimule la sécrétion de la thymuline;

au niveau de l'immunité cellulaire: sa carence dans le sang réduit la numération lymphocytaire, notamment T, la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes et aux

mitogènes, l'activité de cellules tueuses naturelles (natural killers ou NK), tandis qu'augmente l'hypersensibilité cutanée, et la cytotoxicité des cellules spléniques;

5 au niveau de l'immunité humorale: sa carence réduit la production des lymphokines et des immunoglobulines IgG et IgM, et la sécrétion de la thymuline dans le serum.

1,2 Manganèse

10 Le manganèse Mn^{2+} non seulement favorise une production normale d'anticorps, mais est même indispensable, ainsi que pour l'activité normale des enzymes nucléases et polymérases notamment l'ADN-polymérase; il influence l'immunocompétence par action sur les fonctions neutrophiles et sur les macrophages;

1,3 Sélénium

15 Il stimule les réponses anticorps T-dépendantes et celles d'hypersensibilité retardée; il augmente le titre des anticorps; il exerce une action antiinflammatoire et antiradicalaire.

1,4 Cuivre Cu^{2+}

20 Il favorise l'efficacité, la synthèse et la libération d'interféron, ainsi que la mobilité des leucocytes phagocytants, et stimule l'activité antiinfectieuse.

1,5 Fer Fe^{2+}

Il favorise également l'efficacité de l'interféron et son effet sur les radicaux libres.

25 2 Vitamines essentielles

2,1 Vitamines liposolubles

2,11 Vitamine A

Le β -carotène stimule les réponses anticorps, la prolifération lymphocytaire et la résistance antiinfectieuse,

tant en fréquence qu'en sévérité; il exerce un effet antiradicalaire et son rôle immunologique est considéré comme capital.

2,12 Vitamine E

5 L' α -tocophérol stimule également les réponses anticorps et celles d'hypersensibilité retardée, la prolifération lymphocytaire et la résistance antiinfectieuse; il joue un rôle dans le piégeage des radicaux libres. Cofacteur du selenium, ces deux micronutriments potentialisent leurs effets
10 lorsqu'administrés simultanément.

2,2 Vitamines hydrosolubles

2,21 Vitamine B6

La pyridoxine favorise la production de thymuline, la normalisation des réponses lymphocytaires, la stimulation des
15 réponses d'hypersensibilité retardée et des réponses anticorps, notamment postvaccinales, ce qui importe d'autant plus que certains stimulants immunitaires comme le Biostim exercent un effet voisin de celui des vaccins. La vitamine B6 est, de plus, le cofacteur du zinc, donc indispensable à son action.

20 2,22 Vitamine B9 ou Bc ou M

L'acide folique normalise les réactions cutanées aux antigènes et les réponses lymphocytaires aux mitogènes; Sa carence ou celle en folates, notamment chez les sujets atteints du SIDA, entraîne des troubles neurologiques.

25 3 Acides aminés essentiels

3,1 Alanine

Elle augmente la reproduction lymphocytaire et contribue à la croissance thymique.

3,2 Glycine

Sous forme de diméthylglycine (DMG), elle favorise la réponse anticorps, et, en particulier, elle multiplie par quatre cette réponse aux vaccins pneumococciques; elle augmente également la réponse immunitaire cellulaire par stimulation du métabolisme des globules blancs.

3,3 Thréonine

Elle stimule la production des anticorps T et l'accroissement des immunoglobulines IgG et IgM;

10 3,4 Acide aspartique

L'acide aspartique, notamment sous forme d'aspartate favoriserait la prolifération et la différenciation du thymus et de la moelle osseuse; il stimule la survie après irradiation totale avec régénération des organes producteurs d'érythrocytes, ainsi que le métabolisme de l'ADN.

Il convient de noter que même si certaines associations sont connues pour faire jouer aux composants un rôle dit de co-facteur (zinc/vitamine B6, zinc/manganèse, sélénium/vitamine E, par exemple), et comme cela a été souligné plus haut, les résultats in vivo ne sont généralement pas à la hauteur de ceux que l'on pouvait escompter sur la base des expérimentations in vitro, ou sur l'animal.

Or l'expérience a montré que, par un choix judicieux de composants micronutriments et immunostimulants, même des immunostimulants classiques, on pouvait parvenir à un effet de synergie surprenant se traduisant notamment par une potentialisation des effets des divers constituants et une efficacité largement accrue par rapport aux associations antérieures.

Pour mieux faire comprendre les caractéristiques techniques et les avantages de la présente invention, on va en décrire des exemples de réalisation étant bien entendu que ceux-ci ne sont pas limitatifs quant à leur mode de mise en oeuvre et aux applications qu'on peut en faire.

Les compositions ci-dessous sont données par capsule molle.

COMPOSANTS	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	Exemple 4
Glycoprotéine anhydre	1 mg	2 mg		
10 Fraction bactérienne			20 mg	20 mg
Cuivre Cu ²⁺		2 mg		4 mg
Fer Fe ²⁺		2 mg		8 mg
Manganèse	2 mg		10 mg	
Sélénium	25 µg		200 µg	
15 Zinc	10 mg		50 mg	
Vitamine A	3000 UI		30000 UI	
Vitamine B6	0,8 mg		2 mg	
Vitamine B9		15 mg		75 mg
Vitamine E	10 mg		40 mg	
20 Alanine	40 mg		60 mg	
Aspartate de magnésium	50 mg	50 mg		100 mg
Diméthylglycine		50 mg		90 mg
Thréonine	50 mg	50 mg		350 mg
Excipients				

25 La glycoprotéine utilisée dans les exemples ci-dessus est, de préférence, celle extraite de *Klebsella pneumoniae*

La fraction bactérienne est constituée, de préférence sous forme lyophilisée à partir de *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella*

pneumoniae, Neisseria catharralis, Staphylococcus aureus, Streptococcus viridans, Streptococcus pyogenes.

Les compositions ci-dessous sont données par comprimé sécable.

COMPOSANTS		Exemple 5	Exemple 6	Exemple 7	Exemple 8
5	Inosine+acédobène				
	+dimépranol	500 mg	500mg		
	Ribosomes de				
	Klebsiella pneumoniae				
	+Diplococcus pneumoniae				
10	+Streptococcus pyogenes				
	+Hemophilus influenzae			3 mg	3 mg
	Cuivre Cu ²⁺		2 mg		4 mg
	Fer Fe ²⁺		2mg		8 mg
	Manganèse	1 mg		8 mg	
15	Sélénium	10 µg		300 µg	
	Zinc	10 mg		100 mg	
	Vitamine A	300 UI		30000 UI	
	Vitamine B6	1 mg		3 mg	
	Vitamine B9		15 mg		75 mg
20	Vitamine E	4 mg		40 mg	
	Alanine	20 mg		60 mg	
	Aspartate de magnésium	50 mg	50 mg		90 mg
	Diméthylglycine		50 mg		90 mg
	Thréonine	50 mg	50 mg		350 mg
25	Excipients				

Dans les huit exemples, les protocoles de fabrication et les excipients peuvent être de tout type classique et adéquat permettant d'obtenir des produits sous formes galéniques pharmaceutiquement acceptables. Ces produits peuvent

généralement être administrés à raison de deux doses unitaires par jour prises ensemble ou séparément matin et soir pendant un mois ou éventuellement plus, selon les cas et au gré du prescripteur, en fonction du retour à la normale des constantes biologiques mesurant le pouvoir immunitaire.

On a pratiqué les expérimentations suivantes portant sur les compositions des huit exemples ci-dessus mises sous forme de solutions, l'eau, ou du serum physiologique pour les essais in vivo, une solution de glycoprotéines extraites de *Klebsiella pneumoniae* et purifiées (référence A), et une solution d'extraits de germes associés et tués, ensuite purifiée (référence B).

Première expérimentation: Stimulation des propriétés phagocytaires de polynucléaires et de macrophages chez la souris.

Les solutions sont administrées pendant un mois en adaptant les doses journalières au prorata des poids des quatre cent quarante souris sélectionnées (quarante par solution à expérimenter).

Sur les polynucléaires, d'une part, et les macrophages, d'autre part, on a pu effectuer les constatations suivantes:

La solution A présente une activité nettement plus importante que celle du sérum aussi bien sur l'ingestion de particules de latex par les cellules que sur leur chimiotactisme;

La solution B, bien que plus active que le sérum l'est moins que la solution A sur l'ingestion de particules de latex, mais approximativement aussi efficace sur le chimiotactisme;

Pour chacune des solutions correspondant aux exemples 1 à 8, l'efficacité est nettement supérieure dans tous les cas, aussi bien sur le chimiotactisme que sur l'ingestion de particules de latex, et aussi bien en ce qui concerne les
5 macrophages que les polynucléaires. Ces résultats sont repris dans le tableau récapitulatif ci-après.

Deuxième expérimentation: Etude de la prolifération lymphocytaire chez l'homme et de l'immunité résultante à la médiation cellulaire.

10 Les lots de quarante souris de chacune des solutions A, B, et des exemples 1 à 8 présentent une prolifération plus importante que celle du lot témoin, cependant, la solution A est un peu plus active que la solution B, mais restant nettement inférieure à celles des solutions correspondant aux
15 exemples 1 à 8, ce qui montre une immunité à la médiation cellulaire résultant de l'application des compositions conformes à l'invention.

Troisième expérimentation: Protection de la souris contre l'infection induite par l'injection.

20 On injecte de l'*Haemophilus influenzae* aux souris et l'on compte les décès. Le sérum physiologique entraîne une mortalité à 100% (quarante souris), la solution A 27,5% de décès (11 souris), la solution B 35% de décès (14 souris) plus rapides qu'avec la A et les solutions résultant des exemples 1 à 8 une
25 moyenne de 7,5% de décès (3 souris) relativement tardifs, ce qui démontre une augmentation de la capacité de réponse immunitaire.

On peut résumer ces résultats comme porté dans le tableau qui suit où

0=nul +=faible ++=moyenne +++=forte

5		Stimul.des propriétés phagocytaires des polynucl. et macroph.		Prolifér. lymphocyt. chez l'Homme	Protection c/l'infect. Haemophilus % de décès
10		ingestion part.latex	chimiotact.		
	témoin	0	0	0	100%
	solution A	++	++	++	27,5%
	solution B	+	++	+	35%
15	sol.ex.1	+++	+++	+++	7,5%
	sol.ex.2	+++	+++	+++	7,5%
	sol.ex.3	+++	+++	+++	5%
	sol.ex.4	+++	+++	+++	10%
	sol.ex.5	+++	+++	+++	5%
	sol.ex.6	+++	+++	+++	7,5%
20	sol.ex.7	+++	+++	+++	7,5%
	sol.ex.8	+++	+++	+++	10%

En fait l'expérience montre que l'on obtient des résultats probants dans les gammes de teneurs suivantes:

Glycoprotéine anhydre de 0,5 à 2 mg

Fraction bactérienne de 10 à 50 mg

Inosine+acédobène

 +dimépranol de 100 à 900 mg

30 Ribosomes de

 Klebsiella pneumoniae

 +Diplococcus pneumoniae

 +Streptococcus pyogenes

 +Hemophilus influenzae de 1 à 20 mg

35 Cuivre Cu²⁺ de 1 à 10 mg

 Fer Fe²⁺ de 1 à 10 mg

 Manganèse de 0,5 à 10 mg

 Sélénium de 10 à 300 µg

 Zinc de 5 à 150 mg

40 Vitamine A de 300 à 40 000 UI

	Vitamine B6	de	0,5	à	5	mg
	Vitamine B9	de	5	à	100	mg
	Vitamine E	de	2	à	150	mg
	Alanine	de	10	à	500	mg
5	Aspartate de magnésium	de	10	à	500	mg
	Diméthylglycine	de	10	à	250	mg
	Thréonine	de	10	à	400	mg

Les compositions médicamenteuses immunostimulatrices conformes à l'invention se révèlent donc à propriétés très renforcées par rapport à celles de l'art antérieur, grâce au fait qu'elles contiennent au moins un immunostimulateur associé avec au moins un micronutriment, les immunostimulateurs comprenant des éléments bactériens (tels que des bactéries proprement dites, des fractions de germes, des glycoprotéines ou des ribosomes bactériens et des protéoglycanes membranaires), des polypeptides biologiques et/ou des immunostimulants de synthèse, les micronutriments comprenant, de leur côté, des oligoéléments, des vitamines et/ou des acides aminés essentiels.

REVENDEICATIONS

- 1 Composition médicamenteuse immunostimulatrice à propriétés renforcées caractérisée par le fait qu'au moins un immunostimulateur est associé avec au moins un micronutriment;
- 5 2 Composition selon la revendication 1 caractérisée par le fait que les immunostimulateurs comprennent des éléments bactériens;
- 3 Composition selon la revendication 2 caractérisée par le fait que les éléments bactériens sont choisis parmi les
- 10 bactéries proprement dites, des fractions de germes, des glycoprotéines ou des ribosomes bactériens et des protéoglycanes membranaires;
- 4 Composition selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisée par le fait que les immunostimulateurs comprennent
- 15 des polypeptides biologiques;
- 5 Composition selon l'une des revendications 2 à 4 caractérisée par le fait que les immunostimulateurs comprennent des immunonostimulants de synthèse;
- 6 Composition selon l'une des revendications 1 à 5
- 20 caractérisée par le fait que les micronutriments comprennent des oligoéléments;
- 7 Composition selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée par le fait que les micronutriments comprennent des vitamines;
- 25 8 Composition selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée par le fait que les micronutriments comprennent des acides aminés essentiels;
- 9 Composition selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisée par le fait qu'elle contient au moins deux des

constituants suivants dans la gamme de teneurs indiquées par unité:

	Glycoprotéine anhydre	de	0,5	à	2	mg
	Fraction bactérienne	de	10	à	50	mg
5	Inosine+acédobène					
	+dimépranol	de	100	à	900	mg
	Ribosomes de					
	Klebsiella pneumoniae					
	+Diplococcus pneumoniae					
10	+Streptococcus pyogenes					
	+Hemophilus influenzae	de	1	à	20	mg
	Cuivre Cu ²⁺	de	1	à	10	mg
	Fer Fe ²⁺	de	1	à	10	mg
	Manganèse	de	0,5	à	10	mg
15	Sélénium	de	10	à	300	µg
	Zinc	de	5	à	150	mg
	Vitamine A	de	300	à	40 000	UI
	Vitamine B6	de	0,5	à	5	mg
	Vitamine B9	de	5	à	100	mg
20	Vitamine E	de	2	à	150	mg
	Alanine	de	10	à	500	mg
	Aspartate de magnésium	de	10	à	500	mg
	Diméthylglycine	de	10	à	250	mg
	Thréonine	de	10	à	400	mg

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9104194
FA 455270

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO-A-9 015 596 (ALPHA BETA TECHNOLOGY)(27-12-1990) * Page 5, ligne 26 - page 6, ligne 13; page 8, ligne 10 - page 9, ligne 16 * ---	1-5,7-9	
X	WO-A-8 400 688 (DUSSOURD)(01-03-1984) * Page 1, lignes 8-21 * ---	1-3	
X	ARZNEIM. FORSCH., vol. 30, no. 1A, 1980, pages 142-172; R. FONTAGNES: "Study of the immunogenity of ribosomes and ribosomal RNA extracted from K. Pneumoniae and S. pneumoniae" * Page 142: "Summary" * ---	1-3	
X	US-A-4 525 350 (CASEY)(25-06-1985) * Colonne 2, lignes 39-68 * ---	1,7	
A	FR-A-2 563 435 (BERDAL)(31-10-1984) -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 61 K
Date d'achèvement de la recherche 18-12-1991			Examineur TURMO Y BLANCO C.E.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

